重离子射线局部照射技术在昆虫机能解析中的应用

屠振力[1]，小林泰彦[2]，木口宪而[3]

（1. 浙江大学动物科学学院，杭州 310029；2. 日本原子能研究所，Takasaki 370-1292，日本；
3. 日本信州大学纤维学部，Ueda 386-8567，日本）

摘要：为了探索重离子射线局部照射使昆虫体内某一特定的组织或器官失去活性这一放射线显微手术技术的有效性和可能性，用碳离子射线（$^{12}C^{5+}$，18.3 MeV/u）对家蚕 *Bombyx mori* 幼虫进行了全体照射或局部照射。研究结果表明：与全体照射不同，局部照射后的个体与对照个体在存活率及茧质等性状上没有明显的差异，只是由于照射剂量及照射部位的不同，在照射部位出现局部的影响。对 4 龄第 3 天幼虫的造血器官进行局部照射后，其造血功能遭到破坏，血液中的游离血球数明显下降。因此利用重离子射线局部照射技术能够替代某些传统的外科手术，破坏昆虫体内特定的组织或器官，以便进行该器官或组织的机能研究。

关键词：家蚕；重离子射线；局部照射；器官

中图分类号：Q691；Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2004)06-0844-05

Application of heavy ion beams radio-surgery to function analysis of insect specific organ

TU Zhen-Li[1]，KOBAYASHI Yasuhiko[2]，KIGUCHI Kenji[3]（1. College of Animal Sciences，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China；2. Japan Atomic Energy Research Institute，Takasaki 370-1292，Japan；3. Faculty of Textile Science and Technology，Shinshu University，Ueda 386-8567，Japan）

Abstract: To test the validity of radio-surgery of heavy ion beams，which inactivate a specific organ through local irradiation，silkworms（*Bombyx mori*）were whole-body exposed or locally irradiated with carbon ion beams（$^{12}C^{5+}$；18.3 MeV/u）. Between controls and larvae locally irradiated at the wandering stage，no significant differences in either survival or cocoon quality were observed. Only localized effects were observed，depending on both dose and site of irradiation，but this was not true for whole-body irradiated larva. After local irradiation of the hemopoietic organs at the 4th instar premolting stage，the hemocyte densities were clearly reduced and the hemopoietic organs capacity was disrupted. The results show that radio-surgery utilizing heavy ion beams can destroy a specific organ or tissue in a larva of insect.

Key words: *Bombyx mori*；heavy ion beam；local irradiation；organ

重离子射线是一种高能宇宙射线，具有很强的能量传递性（linear energy transfer）及很高的相对生物效能（relative biological effectiveness），在生物体内照射的深度及范围能够控制（Kraft，1987；Blakely，1992；Tanaka *et al*.，1997）。在医学领域，可以利用这些特点对很难进行外科手术的、存在于深部的人体患病组织或器官进行放射线显微手术，特别是进行癌细胞的杀灭和去除等临床试验（Castro *et al*.，1985；Saunders *et al*.，1985；Austin-Seymour *et al*.，1989；Akanuma and Matsutani，1995）。

在昆虫的机能研究中，经常利用外科手术摘除昆虫的某一器官或组织，然后解析其对机体的影响（Yamagichi and Hirao，1934；Nittono *et al*.，1964），但这种方法容易受出血及组织或器官存在部位的特殊性的影响。因此，迫切希望能有一种利用重离子射线局部照射，使昆虫体内某一特定的组织或器官失

基金项目：日本原子能研究所博士研究员基金；浙江大学留学回国人员基金(581608)及浙江大学人才引进专项基金(584601)

作者简介：屠振力，男，1966 年 5 月生，博士，副教授，从事分子生物学、放射生物学及昆虫机能利用学研究，E-mail：tuzl@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2003-11-24；接受日期 Accepted：2004-02-16

活的技术，以代替传统的外科手术。日本原子能研究所高崎研究所为了研究重离子射线对生物的影响，从 1991 年开始，建立了用于材料和生物领域研究的重离子照射装置，已经开展了在花卉及作物育种上的应用研究（Kishinami，1994；Nagatomi *et al*.，1995；Tanaka *et al*.，1997）。国内对于重离子射线对生物的影响研究及其重离子射线局部照射技术应用于昆虫的组织器官的机能解析中的可能性等研究还未见报道。

本研究主要目的是为了探索重离子射线局部照射使昆虫体内某一特定的组织或器官失去活性的有效性和可能性，利用重离子射线对家蚕幼虫进行全体照射或局部照射，比较了照射后的存活率以及对某些生理性状的影响。同时对家蚕幼虫的成虫器官芽存在部位进行局部照射，以研究照射后的器官形态及其机能的变化。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

家蚕 *Bombyx mori* 着色非滞育系统（*pnd*），饲养条件为 25 ± 1℃，相对湿度 70% ~ 80%。幼虫用人工饲料饲育，取 4 龄第 3 天的幼虫及熟蚕用于实验。

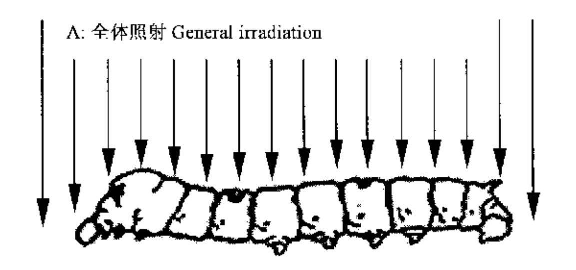
1.2　重离子射线照射装置及方法

利用日本原子能研究所高崎研究所的重离子照射研究设施中的深度控制种子照射装置，供试重离子射线的种类为碳离子（$^{12}C^{5+}$，18.3 MeV/u，水中的射程为 1.1 mm）。

全体照射方法：将幼虫置于重离子射线照射用试料台上，并以透明胶带纸作部分固定（厚度 63 μm），从幼虫的背部进行照射（图 1：A）。局部照射方法：先在 2.0 mm 厚的丙烯酸树脂板上，制作与目的部位的形状和大小相吻合的孔，将孔对准照射目的部位，并用透明胶带纸将幼虫部分固定在照射用试料台上（图 1：B），用 10 ~ 500 Gy 相当的碳离子射线进行照射。碳离子射线的水中射程约为 1.1 mm，树脂板的厚度为 2.0 mm，因此，碳离子射线不能穿过该丙烯酸树脂板。

1.3　照射后的观察方法

照射后，4 龄第 3 天幼虫与对照幼虫（未照射）同时按常规方法用人工饲料饲养。熟蚕时将其放入事先垫有卫生纸的塑料容器内，使其吐丝结茧，按常规方法进行调查。血球密度（total hemocyte count per mm^3）的测定采用 THOMA 血球计算板进行。每一处理的调查个体数为 12 ~ 18 头。



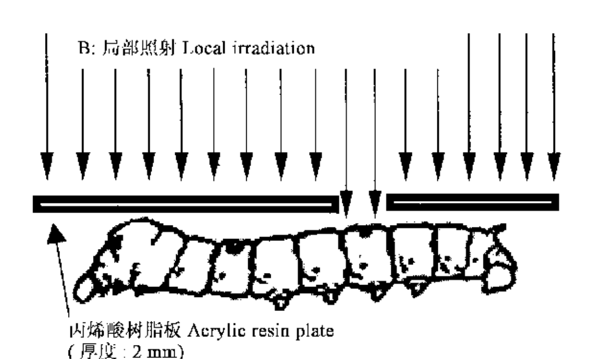


图 1　照射方法模式图

Fig.1　Model picture of irradiation method

在 2 mm 厚的丙烯酸树脂板上制作各种形状和大小的孔，通过此孔对目的部位进行局部照射

Holes of various sizes and shapes were made on acrylic resin plates (2 mm in thickness), and for local irradiation, target sites were exposed to heavy ion beams through the holes.

2　结果

2.1　全体照射或局部照射对家蚕存活率的影响

用 10 ~ 500 Gy 碳离子射线照射熟蚕（雌）后对其存活率的影响见图 2。全体照射下，随着照射剂量的增加，结茧率、化蛹率及羽化率等都有所下降，500 Gy 的照射区几乎所有的照射个体都不能生存。与此相反，通过丙烯酸树脂板上的长方形孔（10 mm × 6 mm）对家蚕第 8 体节进行局部照射下，对结茧率、化蛹率及羽化率等几乎没有影响，照射个体都能正常结茧及化蛹；500 Gy 的照射区也有约 90 % 的个体能正常羽化。

2.2　全体照射或局部照射对茧质及产卵能力等的影响

用 100 Gy 碳离子射线照射熟蚕（雌）后对其茧质及产卵能力等的影响见表 1。除全体照射后存活蚕的茧重比对照蚕的略轻以外，局部照射蚕的茧形及茧重与对照蚕几乎没有显著差异，但不同的照射部位产生特异性的照射影响。全体照射后，成虫表

现为翅缺失及雌性个体不能产卵；而局部照射仅产生特定的照射影响，如局部照射家蚕幼虫第8体节的背侧（卵巢存在部位）后，与全体照射后的个体一样，羽化的所有雌性个体都不能产卵，但翅的形成及其他性状与对照蚕之间几乎没有大的差异。局部照射家蚕幼虫的第2、3体节（翅芽存在部位）后，对其生殖机能几乎没有影响，仅表现在翅的形态形成上受阻（表1）。对家蚕幼虫左侧的翅芽进行局部照射后，成虫仅表现为左侧的翅缺失而右侧翅正常，相反对右侧的翅芽进行照射后，仅右侧的翅缺失而左侧翅正常（图3：B，C）；只有对左右两侧的翅芽同时进行照射时，才出现成虫的左右两侧翅的完全缺失（图3：D）。

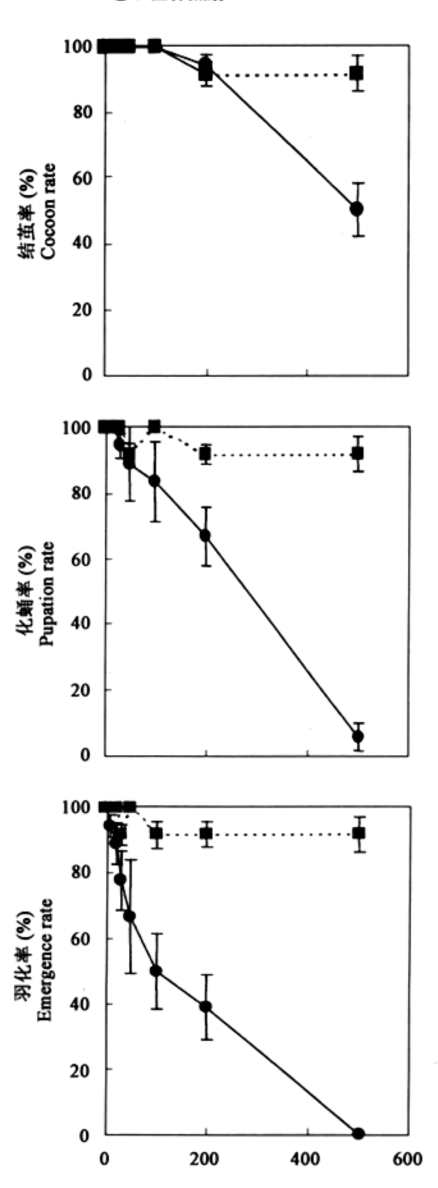


图2 重离子射线照射对家蚕结茧率、化蛹率及羽化率的影响

Fig. 2 Effects of general or local irradiation on cocoon rate, pupation rate and emergence rate of the silkworm

表1 重离子射线照射对家蚕的茧质及产卵能力等的影响

Table 1 Effects of general or local irradiation on cocoon and egg production of the silkworm

照射类型 Type of irradiation	茧重(g) Cocoon weight	翅形态 Morphology of wing	成熟卵数 Number of mature eggs
对照 Control	1.03 ± 0.04 a	正常 Normal	458 ± 41
局部照射 Local irradiation			
卵巢 Ovaries	0.99 ± 0.17 a	正常 Normal	0
翅原基 Wing discs	1.02 ± 0.18 a	缺失 Lack	432 ± 44
全体照射 General irradiation	0.90 ± 0.07 b	缺失 Lack	0

表中数据为平均值 ± 标准差，数据后有不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$），t 检验。

The data in the table indicate mean ± *SD* and those followed by different small letters show significant at $P < 0.05$. t-test.

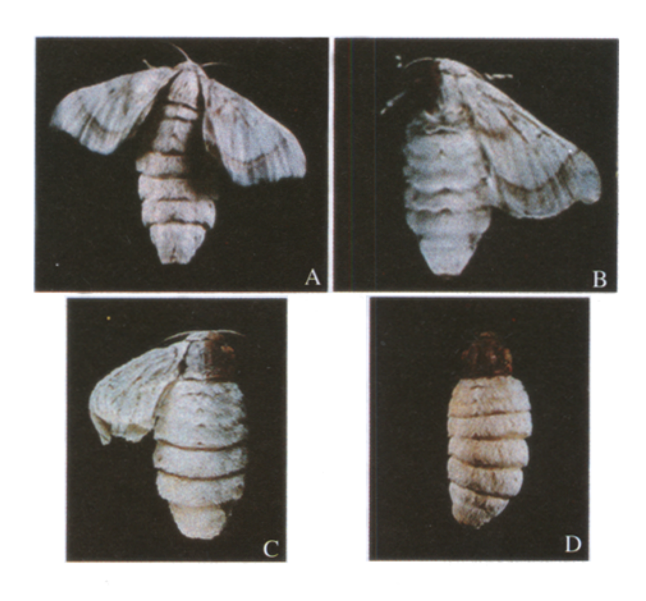


图3 局部照射家蚕幼虫翅芽后对成虫翅形成的影响

Fig. 3 Abnormal morphology of adult moths after local irradiation

A：对照 Control；B：左侧翅芽照射 Left wing disc was irradiated；C：右侧翅芽照射 Right wing disc was irradiated；D：两侧翅芽照射 Both sides wing disc were irradiated.

2.3 局部照射家蚕幼虫造血器官对其血液中游离血球数的影响

为了确定重离子射线局部照射能否选择性地破坏生物体内特定组织或器官的机能，用100 Gy碳离子射线局部照射4龄第3天幼虫的造血器官。结果表明：局部照射后，到5龄第3天为止，家蚕幼虫血

液中的游离血球数几乎没有上升，维持在5龄起蚕的水平；第4天后游离血球数虽有所上升，但与对照蚕相比仍停留在一个较低的水平（图4）。而对照蚕，5龄起蚕到第3天之间血液中的游离血球数缓慢增多，第3天以后游离血球数急速上升，到熟蚕时达到最大值。

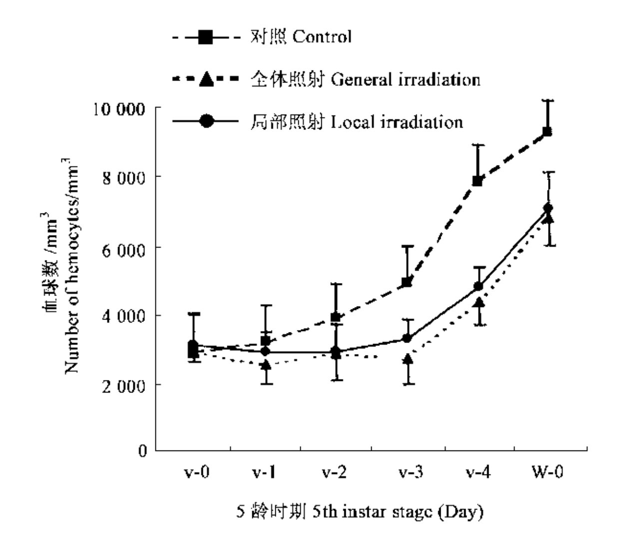


图4　重离子射线照射后家蚕5龄幼虫血液中血球密度的变化

Fig. 4　Change of hemocyte densities in hemolymph of the 5th instar silkworm after heavy ions irradiation

v-x：5龄第x天 Day x of the 5th instar；W：熟蚕 Wandering stage.

3　讨论

本研究结果显示用重离子射线局部照射家蚕幼虫后对幼虫的发育、存活率及其茧质性状等都没有很大的影响，仅在照射部位出现局部的影响（图2，表1）。对左或右侧的翅芽存在部位进行局部照射时，仅照射一侧的成虫翅出现缺失，另一侧是正常的；只有对左右两侧的翅芽存在部位同时进行局部照射时，才出现成虫的左右两侧翅的完全缺失（图3）。另外，不同的组织器官对重离子射线的感受性不同（Tu *et al*.，1999）。因此，用一定剂量的重离子射线对目的器官或组织进行局部照射是完全可以杀灭该组织或器官的。

家蚕幼虫的造血器官附着在第2、3体节的翅芽的表面（Akai and Sato，1971；Sato and Akai，1977），因此对左右两侧翅芽存在部位进行重离子射线局部照射，可以破坏造血器官的功能。照射蚕与对照蚕不同，5龄前期血液中的游离血球数几乎没有增加，后期虽有增加，但明显地比对照蚕要低得多（图4）。另外，也发现了因血液中的游离血球数的变动，而影响到血液中蛋白质的成分变化（另文发表）。个体间的生理差异经常反映在血液成分的差异上（Doira，1968；Banno *et al*.，1993），造血器官的功能受到破坏而使血球的形成受阻，也可能引起血液成分发生变化。因此，重离子射线局部照射能够破坏造血器官的功能，可以用来分析血球的生理机能。

在昆虫生理功能的研究中，经常利用某一器官或组织的摘除术，来阐明其对机体的影响（Yamagichi and Hirao，1934；Nittono *et al*.，1964），但这种外科手术对虫体损伤很大，死亡率高或发育延迟，而且出血的影响不能被忽视，另外由于昆虫个体小，进行手术是很困难的；Gamo等（1959）曾通过注射放射线同位素（内照射）的方法来解析某一组织或器官的机能，但这种方法处理后得到的目的器官机能不全的个体概率很低，而且即使得到了这样的个体，但因所有组织器官都被放射线感染，要解析某一器官的机能是很困难的。与上述方法相比，重离子射线局部照射技术不伴有出血，除了受照射部位之外，对其他部位没有不良影响。因此，对于家蚕这样的小动物，也可用重离子射线局部照射来破坏生物体内某一特定的组织或器官，以研究生物某一特定的组织或器官的功能。如对家蚕发育初期卵的不同部位进行局部照射，明确照射部位与组织器官形成特异性的关系，制作家蚕卵的发育命运图，从而阐明生物种的发生及分化过程。

将来应用该技术对中枢神经系统特别是脑的各种部位进行重离子射线局部照射，可以进行脑的神经分泌细胞对内分泌控制及行为控制等方面的研究。

参考文献（References）

Akai H，Sato S，1971. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*.，17：1 665－1 677.

Akanuma A，Matsutani M，1995. Foundation and present condition of heavy ion beams application（Application to radiotherapy）. *Radioisotopes*，44：920－927.

Austin-Seymour M，Munzenrider J，Goitein M，Verhey L，Urie M，Gentry R，Birnbaum S，Ruotolo D，McManus P，Skates S，Ojemann RG，Rosenberg A，Schiller A，Koehler A，Suit HD，1989. Fractionated proton radiation therapy of chordoma and low-grade chondrosarcoma of the base of the skull. *J. Neurosurg*.，70：13－17.

Banno Y，Tochihar S，Kawaguchi Y，Doir H，1993. Hemolymph proteins during larval development of *Bombyx mori*："proteins of young larvae". *J. Seri. Sci. Jpn*.，62：187－194（in Japanese）.

Blakely EA，1992. Cell inactivation by heavy charged particles. *Radiat*.

Environ. Biophys., 31: 181 – 196.

Castro JR, Saunders WM, Austin-Seymour MM, Woodruff KH, Gauger G, Chen GTY, Collier JM, Phillips TL, Zink SR, 1985. A phase Ⅰ-Ⅱ trial of heavy charged particle irradiation of malignant glioma of the brain: A northern California concology group study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11: 1 795 – 1 800.

Doira H, 1968. Developmental and sexual differences of hemolymph proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Sci. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 23: 205 – 214 (in Japanese).

Gamo T, Nishiyama H, Konayashi A, 1959. Studies on the influence of radio-active rays upon the physiological functions of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Ⅲ): On the effects of concentration of ingested radio-isotopes on the number of hemocytes of the silkworm. *Bull. Sci. Fac. Textile. Shinshu Univ.*, 9: 83 – 91 (in Japanese).

Kishinami I, 1994. Mutations induced by ion beam ($^{12}C^{5+}$) irradiation in barley. *TIARA Annual Report*, 3: 30 – 31.

Kraft G, 1987. Radiobiological effects of very heavy ions: inactivation, induction of chromosome aberrations and strand breaks. *Nucl. Sci. Appl.*, 3: 1 – 28.

Nagatomi S, Tanaka A, Kato A, Watanabe H, Tano S, 1995. Mutation induction on chrysanthemum plants regenerated from *in vitro* cultured explants irradiated with $^{12}C^{5+}$ ion beam. *TIARA Annual Report*, 5: 50 – 52.

Nittono Y, Tomabechi S, Onodera N, 1964. Formation of hemocytes near imaginal wing discs in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Preliminary note). *J. Seri. Sci. Jpn.*, 33: 43 – 45 (in Japanese).

Rydberg B, Lobrich M, Cooper PK, 1994. DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts. 1. Pulsed-field gel electrophoresis method. *Radiat. Res.*, 139: 133 – 141.

Sato S, Akai H, 1977. Development of hemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 46: 397 – 403 (in Japanese).

Saunders WM, Chen GT, Austin-Seymour M, Castro JR, Collier JM, Gauger G, Gutin P, Phillips TL, Pitluck S, Walton RE, Zink SR, 1985. Precision, high dose radiotherapy. Ⅱ. Helium ion treatment of tumors adjacent to critical central nervous system structures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11: 1 339 – 1 347.

Tanaka A, Tano S, Chantes T, Yokota Y, Shikazono N, Watanabe H, 1997. A new *Arabidopsis* mutant induced by ion beams affects flavonoid synthesis with spotted pigmentation in testa. *Gene Genet Syst.*, 72: 141 – 148.

Tu ZL, Yamasaki S, Shirai K, Kanekatsu R, Kiguchi K, Kobayashi Y, Taguchi M, Watanabe H, 1999. Effects of general and local irradiation of heavy ion beams on the development and morphogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 68: 443 – 453 (in Japanese).

Yamagichi T, Hirao K, 1934. The interaction of organs of the silkworm *Bombyx mori*. (Ⅰ): Compensatory hypertrophy of the silk gland. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 6: 168 – 172 (in Japanese).

(责任编辑：黄玲巧)